Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
und Röntgendiagnostik der Universität in Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. F. Heß

Das Verhalten der serumgebundenen Sialinsäuren-Konzentration bei Tumorpatientenseren

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg an der Lahn

vorgelegt von
Michael Marbaise aus Gersfeld

Marburg, im August 1978

Fotodruck Symon und Wagner OHG · 3550 Marburg · Biegenstraße 5

Aus der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie
und Röntgendiagnostik der Universität in Marburg/Lahn
Direktor: Prof. Dr. F. Heß

Das Verhalten der serumgebundenen Sialinsäuren-Konzentration bei Tumorpatientenseren

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg an der Lahn

vorgelegt von
Michael Marbaise aus Gersfeld

Marburg, im August 1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von dem Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am ...27.10.1978...
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. Neurath
Referent: Prof. Dr. Heß
Correferent: Prof. Dr. Bernhardt

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
I.1	Die Bedeutung sialinsäurehaltiger Serumglykoproteine	3
I.2	Neuraminsäure und Tumorimmunität	6
II.	Material und Methoden	13
III.	Ergebnisse	19
IV.	Diskussion	29
	Zusammenfassung	40
	Literatur	42

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546009_0060

I. EINLEITUNG

Die Neuraminsäure stellt den charakteristischen Anteil der sauren Glykoproteide des Serums dar und kann als Kondensationsprodukt von Mannosamin und Brenztraubensäure aufgefaßt werden. Es verleiht diesen Proteiden einen wesentlichen Anteil ihrer elektrophoretischen Mobilität. In biologischen Membranen bildet es zusammen mit Oligosaccharidketten den hydrophilen Anteil der Glykosphingolipide, die besonders reichlich als Ganglioside im Hirn vorliegen. Ebenso bildet es den hydrophilen Anteil von membranspezifischen Glykoproteiden zusammen mit Oligosaccharidketten.

Die biologische Funktion der Neuraminsäure ist bis heute unbekannt. Es bestehen lediglich Vermutungen, die sich auf die negative elektrische Ladung beziehen, so z.B. soll die Verknüpfung der Neuraminsäure mit Oligosacchariden die immunologische Erkennbarkeit von den Trägerproteinen beeinträchtigen bzw. verändern. Es gibt eine Reihe von Versuchen (Heide, 1974), aus denen hervorgeht, daß die Halbwertszeit von Glykoproteinen des Serums nach Inkubation derselben mit Neuraminidase stark abnimmt. Hierbei besteht eine erhöhte Abbaurate dieser Proteine durch die Leber. Offensichtlich wird durch die Abspaltung der Sialinsäuren durch die Neuraminidase die Leber befähigt, die Glykoproteine zu erkennen und aus der Zirkulation zu eliminieren. Hierbei werden die Proteine an die Leberzellmembran gebunden, wahrscheinlich über spezifische Transferasen. In ähnlicher Weise werden Lymphozyten und Thrombozyten nach Inkubation mit Neuraminidase bevorzugt in der Leber fixiert, um erst nach einer gewissen Latenzperiode, wahrscheinlich nach der Neusynthese

von Neuraminsäure, wieder ihre spezifischen Zielorgane (Lymphknoten, Milz) aufzusuchen. (Hughes, 1972).
Weitere Versuche haben gezeigt, daß die Neuraminsäure der Zellmembranen als eine Art biologische Tarnkappe gegenüber dem Immunerkenntnissystem wirkt. So findet sich in der Glykokalix der Plazenta in hoher Konzentration eine neuraminsäurehaltige Kohlehydratschicht. Die Anwendung von Neuraminidase bei schwangeren Versuchstieren führt zum Abort; wahrscheinlich durch die Demaskierung von Transplantations-Antigenen der Trophoblastenoberfläche. Ein weiteres Beispiel der Demaskierung von immunogenen Determinanten bietet die Inkubation von Neuraminidase mit Erythrozyten, wodurch eine hämolytische Anämie mit stark verkürzter Lebenszeit derselben induziert werden kann.

In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, daß umgekehrt Zellen mit einer hohen Neuraminsäurekonzentration in ihren äußeren Membrananteilen eine besonders schwache Immunogenität besitzen. Hierzu gehören vor allem Tumorzellen, deren elektrophoretische Mobilität durch Neuraminidase beeinflußt werden kann. Hierbei sind besonders Versuche von BEKESI und SANFORD (1974) zu erwähnen, die durch Abspaltung der Neuraminsäure von Leukämiezellen und Melanomzellen bei Versuchstieren und im Humanversuch eine Stimulierung der Tumorabwehr nachweisen konnten.
Es schien uns daher von Interesse, festzustellen, ob sich im Serum von Tumorpatienten erhöhte Spiegel an durch Hydrolyse freisetzbaren Sialinsäuren nachweisen ließen. Diese erhöhten Konzentrationen könnten sich als Ursache der bei Tumorpatienten zu beobachtenden abgeschwächten humoralen Immunität erweisen.
Arbeiten von WATKINS (1974) zeigen, daß das Serum von Tumorpatienten die blastische Transformation von Wirts-Lymphozyten gegen neuraminidasebehandelte syngene Tumor-

zellen blockiert. Die Blockade korreliert mit der Höhe der Konzentration der serumgebundenen Sialinsäure. Nur in einem kleinen Teil der untersuchten Tumorseren fand sich eine lymphoblastische Transformation der Wirts-Lymphozyten gegen intakte Tumorzellen. Nach Neuraminidase-Behandlung der autochtonen Tumorzellen fand sich eine deutliche Verstärkung der lymphoblastischen Transformation von Wirts-Lymphozyten.
Es ist somit anzunehmen, daß ein neuraminsäurehaltiges Serumprotein im Blut von Tumorpatienten die tumorspezifische zelluläre Immunität supprimiert.

I.1 Die Bedeutung sialinsäurehaltiger Serumglykoproteine

Die Neuraminsäure nimmt in den Oligosaccharideinheiten der Glykoproteine eine endständige Position ein. Als negativ geladene Kohlenhydratgruppe trägt sie zum sauren Charakter und zur besseren Löslichkeit der Proteine bei. Sie hat Einfluß auf ihre Struktur und schirmt den Proteinanteil vor Fermentreaktionen ab. Sie selbst ist nicht immunogen, hindert aber Proteindeterminanten an ihrer Immunogenität.
Tabelle 1 zeigt eine Aufstellung der wichtigsten neuraminsäurehaltigen Serumproteine.

Tabelle 1

	Gesamt-zuckergehalt in %	NANA %	% des Gesamt-zuckergehaltes
Gc-Komponenten	4,2	0	0
C1 q	7,81	0,31	3,8
IgM	11,8	1,3	11
Thyroxin-bind. Globulin	14,8	3,7	23
α_1-Antitrypsin	12,2	3,4	28
α_1-saures Glykoprotein	37,9	10,9	29
Ceruloplasmin	7,9	2,4	30
C1-Inaktivator	34,3	14,3	38
γ_2-Glykoprotein	10,0	5,5	55

Die Entfernung der Neuraminsäure von sialinsäurehaltigen Glykoproteinen hat z.T. eine deutliche Auswirkung auf ihre Funktion. So resultiert die Entfernung der Neuraminsäure vom Fibrinogenmolekül in einer Änderung der Fibringerinnselstruktur. Ebenso wird Vitamin B_{12} in stärkerem Ausmaß an sialinsäurefreies α_1-saures Glykoprotein gebunden. Ceruloplasmin wird nach Desialinisierung in seiner Funktion nicht beeinträchtigt. Andere Funktionen wie z.B. der Migrations-Inhibitions-Faktor werden durch Desialinisierung inaktiviert.

Sialinsäurefreie Glykoproteine werden beschleunigt aus dem Serum durch die Leber extrahiert. Dasselbe passiert mit Lymphozyten, die mit Neuraminidase vorbehandelt wurden. Ein besonders sialinsäurereiches Glykoprotein auf der Membran von Carcinomzellen ist der C 1-Inaktivator (Osther, 1973). Es blockiert oder inhibiert die zytolytische Aktivi-

tät des humoralen immunologischen Systems.
Die Inhibition der durch Influenzaviren bedingten Hämagglutination durch neuraminsäurehaltige Glykoproteine läßt eine Rezeptorfunktion für die Sialinsäuren vermuten. Die Aktivität dieser Inhibitoren hängt wahrscheinlich ab von der Anzahl der Sialinsäurereste, die simultan mit komplementären Oberflächenstrukturen auf der Virusoberfläche in Kontakt treten können.
Nach heutiger Ansicht sind die Neuraminsäuren Rezeptoren im Erkennungsprozeß von Oberflächenstrukturen. Als solche Beispiele sind anzusehen:

1. Hormone, wie das Choriogonadotropin und FSH, die ihre Zielzellen vermittels der Sialinsäuren finden und durch deren Abspaltung biologisch inaktiviert werden.

2. Die rasche Extraktion von sialinsäurefreien Glykoproteinen durch die Leber. Solange die Sialinsäure endständig war, vermochten die Leberzellen die Glykoproteine nicht zu erkennen. Nachdem durch Entfernung der Sialinsäure Galactose als endständiger Zucker der Kohlenhydratseitenketten exponiert wurde, wurden die Glykoproteine sofort über spezifische Sialyltransferasen der Plasmamembran der Leberzellen erkannt.

3. Die Hämagglutination durch Influenzaviren.

Demgegenüber gibt es zahllose Beispiele, daß Neuraminsäuren immunogene Determinanten von Proteinen abdecken und so quasi als Tarnkappe gegenüber dem Überwachungssystem der zellständigen Immunität fungieren.

I.2 Neuraminsäure und Tumorimmunität

Die Neuraminsäure vermindert die Antigenität ihres Trägerproteins. Die Neuraminsäureabspaltung durch Neuraminidase aus Tumorzellmembranen bedingt

a) eine Verminderung der negativen Ladung der Zellmembran,
b) eine Erhöhung der Zelldeformierbarkeit,
c) eine Verstärkung der Phagozytose der Zellen durch Makrophagen.

Ferner beeinflußt die $^{+}$NANA die Organspezifizität von Zellen, die Zellagglutination sowie die Adhäsivität vor allem der Tumorzellen. Hierdurch soll u.a. das Metastasenmuster bestimmter Tumoren zu erklären sein. Die Neuraminidasebehandlung von Tumorzellen, insbesondere von Leukämiezellen der Maus, führt, wie BEKESI (1974) zeigte, zum Verlust ihrer Infektiosität bei den Wirts-Tieren bei gleichzeitiger Steigerung der humoralen und zellulären Immunität gegen die nichtbehandelten Leukämiezellen.
Durch wiederholte, in 15tägigen Abständen vorgenommene Immunisierung mit neuraminidasebehandelten Leukämiezellen, konnte eine enorme Steigerung der Immunabwehr erreicht werden. Die nachfolgende Injektion von bis zu 5×10^8 lebenden Leukämiezellen wurde ohne Krankheitserscheinung dieser Tiere verkraftet, wohingegen sonst nichtimmunisierte Tiere durch weniger als 10 Leukämiezellen, intraperitoneal injiziert, tödlich infiziert werden können.
Die zusätzliche Bestrahlung der neuraminidasebehandelten Leukämiezellen, oder eine zusätzliche Behandlung mit Mitomycin zur weiteren Devitalisierung der Zellen führte zu keiner weiteren Steigerung der Immunogenität. Alleinige Bestrahlung der Leukämiezellen bewirkte eine um 2 Zehnerpotenzen geringere Immunstimulation.

$^{+}$NANA = N-Acetyl-Neuraminic-Acid

Mehrfach hintereinander gegen neuraminidasebehandelte Leukämiezellen immunisierte Mäuse zeigten eine von der Dosis der jeweils überimpften nicht behandelten Tumorzellen abhängige Steigerung der humoralen und zellulären cytotoxischen Immunität. Leztere hielt noch 210 Tage nach der letzten Impfung an.

Werden empfängliche Mäuse mit 10^7 Leukämiezellen infiziert, so sterben diese Tiere innerhalb 6 1/2 Tagen. Gibt man, 2 Tage nach der Infektion, Methyl-CCNU (20 mg/kg), so erhöht man die Lebenszeit der Tiere auf durchschnittlich 19 Tage, wobei sogar 10% der Tiere überleben. Die alleinige Gabe von Endoxan (135 mg/kg) 2 Tage nach der Tumorüberimpfung, erhöhte die Lebenszeit im Durchschnitt auf 13 Tage, ohne daß ein Tier überlebte.

Die Immunkompetenz der cytostatisch behandelten Mäuse zeigte, gemessen an der PHA-Aktivierung von Milzlymphozyten, eine deutliche Depression, insbesondere durch Endoxan, innerhalb der ersten Woche nach der Gabe des Cytostatikums. Injiziert man 4 Tage nach Beginn der Chemotherapie 10^8 neuraminidasebehandelte Leukämiezellen einmalig in die Peritonealhöhle empfänglicher Mäuse, so erhöht sich die Überlebenszeit der Tiere bzw. die Heilungsquote. Letztere beträgt bei Endoxan 20% bzw. M-CCNU 55% gegenüber 0% bzw. 10% der mit alleinigen Cytostatika behandelten Tiere.

Die LD_{50} gegenüber den Tumorviren war bei der Gruppe der mit Chemotherapie + Immuntherapie überlebenden Mäuse zweitausendfach höher (10^6 Zellen) als die LD_{50} der Tiere, die nach alleiniger Chemotherapie überlebten (500 Zellen).

Die alleinige Immuntherapie der Mäuse-Leukämie durch neuraminidasebehandelte Leukämiezellen erhöht die Überlebenszeit der tumortragenden Tiere nicht.

Im Humanversuch wurde durch die Gruppe von BEKESI die adjuvante Immuntherapie nach cytoreduktiver Chemotherapie der

akuten myeloischen Leukämie mit neuraminidasebehandelten allogenen Myeloblasten eingeführt. Die vorläufigen Ergebnisse, die einen Zeitraum von 60 Wochen überblicken, zeigen, daß die kombinierte Behandlung längere Remissionszeiten bewirken.
WILSON (1974) untersuchte die Wirksamkeit einer postoperativen Immuntherapie mit neuraminidasebehandelten autochtonen Tumorzellen bei Mäusen. Die Tumoren wurden nach Erreichen einer Größe von knapp 2cm Durchmesser zusammen mit der rechten Hinterpfote, auf der sie überimpft worden waren, amputiert. Danach wurden die Tiere in 4 Gruppen eingeteilt:

1. Tiere mit alleiniger Amputation,

2. Tiere, die verschieden hohe Dosen mit Neuraminidase behandelte oder mit 15.000 rad bestrahlte syngene Sarkomzellen appliziert bekamen,

3. Tiere, die mit lebenden Tumorzellen verschiedener Konzentration behandelt wurden,

4. Tiere, die mit verschieden hohen Mengen an lebenden Tumorzellen + zusätzlich subkutanen Injektionen von bestrahlten Tumorzellen behandelt wurden.

Die Ergebnisse zeigen, daß eine Immuntherapie mit 3×10^4 lebenden Zellen, 1×10^4 bestrahlten Zellen oder 3×10^4 neuraminidasebehandelten Zellen zum Zeitpunkt der Amputation zur vollständigen Unterdrückung von Lungenmetastasen führt. Höhere oder niedrigere Dosen waren mit einer höheren Inzidenz von Lungenmetastasen belastet, die für neuraminidasebehandelte Tumorzellen jedoch nicht über derjenigen der alleinigen Amputation lag.
Eine Immuntherapie der Tiere mit lebenden Tumorzellen in einer Dosis, die sonst einen vollständigen Schutz vor Lun-

genmetastasen erzeugte, und subkutaner zusätzlicher Injektion röntgenbestrahlter Tumorzellen (s. Gruppe 4) erhöhte die Zahl der Lungenmetastasen.
Die Immuntherapie 24 Stunden nach Amputation des Tumors mit lebenden oder röntgenbestrahlten Tumorzellen oder einer Kombination beider Zellarten zeigte, verglichen mit der nur operierten Gruppe, keinen zusätzlichen Schutz vor Lungenmetastasen. Lediglich die Gruppe, die mit 10^4 neuraminidasebehandelten Zellen immunisiert worden war, zeigte eine deutliche Senkung der Häufigkeit von Lungenmetastasen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse einer postoperativen Immuntherapie, die den Verhältnissen beim Menschen analog ist, eine stark dosis- und zeitabhängige Wirksamkeit, wobei u.U. ein falscher Zeitpunkt oder eine falsche Dosis zu einer starken Erhöhung der Lungenmetastasierung, verglichen mit der Gruppe mit alleiniger Amputation, führt. Die Variablen, die die Effektivität der Immuntherapie beeinflussen, sind nicht geklärt. Interessant erscheint an der vorliegenden Arbeit, daß eine Neuraminidasebehandlung von Tumorzellen in keiner der beobachteten Gruppen zu einem verstärkten Tumorwachstum geführt hat.
SEDLACEK (1974) untersuchte den Einfluß einer Impfung von transplantablen Mastzell-Tumorzellen bei syngenen Mäusen. Er injizierte diesen Mäusen steigende Dosen dieser Tumorzellen ohne und mit Vorbehandlung durch Neuraminidase. Es fand sich keine signifikante Beeinflussung der mittleren Überlebenszeit von ca. 30 Tagen, weder durch Änderung der Dosis noch durch Vorbehandlung der Zellen mit Neuraminidase.
Behandelte er dagegen die Tumorzellen mit Mitomycin, so fand sich bei der Applikation von $0{,}5 \times 10^2$ und von $1{,}5 \times 10^2$ Tumorzellen ein Überleben aller Tiere. Bei der Appli-

kation von $1,5 \times 10^4$ bzw. $1,5 \times 10^6$ Zellen verstarben hingegen ein Teil bzw. alle Tiere innerhalb 100 Tagen. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß ein Teil der mit Mitomycin behandelten Zellen vital bleiben und bei höheren Dosen das Immunsystem des Wirtes mit dieser vitalen Zellfraktion nicht mehr fertig wird. Eine Immuntherapie mit Tumorzellen, die mit Mitomycin und Neuraminidase vorbehandelt wurden, und die wie o.a. in denselben Dosen appliziert wurden, führte zwar zu einer Verlängerung der Überlebenszeit, verglichen mit den Kontrollen ohne Tumor-Vorbehandlung, jedoch wurde der durch Mitomycin erreichte Effekt bei weitem nicht erreicht.

Den Tieren, die die Immuntherapie länger als 100 Tage überlebten, wurden 500 unbehandelte Tumorzellen überimpft. Hierbei ergab sich, daß diejenigen Tiere, die mit einer kombinierten Mitomycin-Neuraminidase-Tumorimpfung behandelt worden waren, wesentlich besser mit den neuerlich überimpften Tumorzellen fertig wurden als diejenigen Tiere, die mit alleiniger Mitomycin-Tumorimpfung immunisiert worden waren. Für beide Gruppen ergab sich darüberhinaus ein deutlich besserer Schutz durch höhere Erstimmunisierungsdosen.
Derselbe Autor untersuchte an dem Modell des metastasierenden Hunde-Mammacarcinoms die Wirkung einer Immuntherapie mit Mitomycin und Neuraminidase-vorbehandelten autochtonen Tumorzellen. Den Hunden wurde hierzu ein Teil der Tumormasse exstirpiert. Aus dem entnommenen Gewebe wurden die Tumorzellen isoliert und mit Mitomycin und Neuraminidase behandelt. 10^7 Tumorzellen wurden den operierten Hunden am Tag der Operation sowie einen Tag danach subkutan appliziert.

Nach verschiedenen Zeiten (14 bis 400 Tage) wurde bei den Hunden das tastbare Tumorvolumen ermittelt. Hierbei fand

sich eine erhebliche Tumorregression mit fortschreitender Zeit bis auf 7% des Ausgangsvolumens des Tumors.
In einer Kontrollgruppe, der nur mitomycinbehandelte syngene Tumorzellen in denselben Dosen appliziert wurde, nahm das Tumorvolumen dagegen im Durchschnitt beträchtlich zu.
Erhöht man dagegen bei der Immunisierung die Zellzahl der mit Neuraminidase und Mitomycin behandelten Zellen auf 10^8, so folgt ein verstärktes Tumorwachstum, wahrscheinlich durch Immunparalyse oder blockierende Antikörper.

Die vorangegangenen Ausführungen zeigen deutlich, daß durch Neuraminidasebehandlung von Tumorzellen in bestimmten Dosisbereichen eine Verstärkung der spezifischen Tumorimmunabwehr mit entsprechenden klinischen Erfolgen erreicht werden kann. Umgekehrt muß daher gefolgert werden, daß neuraminsäurehaltige Proteine, humoral und zellständig, bei der Immunparalyse des Tumorwirtes eine wichtige Rolle spielen. Dieser Tarnkappeneffekt der Neuraminsäure läßt sich schon an dem Fehlen einer Abstoßungsreaktion gegenüber fötalem Gewebe, an dessen Oberfläche sich eine neuraminsäurereiche Kohlenhydratschicht befindet, ablesen.

Wir fanden es daher von Interesse, die Serumveränderungen der durch Hydrolyse freisetzbaren Neuraminsäure bei Patienten mit histologisch gesichertem Tumorleiden zu bestimmen. Sollte sich hierbei eine Erhöhung des Serumspiegels absichern lassen, so wäre es weiterhin von Interesse, festzustellen, ob sie durch eine Erhöhung normal vorkommender neuraminsäurehaltiger Serumproteine zustande kommt, oder durch ein tumorspezifisches neuraminsäurehaltiges Glykoproteid.
In Anbetracht der Tatsache, daß α_1-saures Glykoprotein im normalen Serum den höchsten Anteil an gebundener Neuramin-

säure hat, untersuchten wir daher, ob eine Parallelität zwischen der Erhöhung dieses Glykoproteins und der durch Hydrolyse freisetzbaren Neuraminsäure des Serums besteht.

II. MATERIAL UND METHODEN

Schwefelsäure, Ortho-Phosphorsäure, Natrium-Meta-Perjodat, Natrium-Meta-Arsenit, Natriumsulfat wurden von Merck AG in Darmstadt bezogen, 2 Thio-Barbitursäure von Serva, Heidelberg.
M-Partigenplatten für die Bestimmung von saurem α_1-Glykoprotein sowie Standard-Human-Serum wurden von den Behringwerken AG Marburg bezogen.

Neuraminsäurebestimmung (nach L. Warren, 1959):

a) Lösungen: zur Herstellung von 0,1143 N Schwefelsäure zur Serumhydrolyse: 320 µl 96%ige Schwefelsäure (Dichte 1,4) wurden ad 100ml mit Bidest versetzt.
Lösungen nach WARREN I: 44,1g Orthophosphorsäure wird mit 8ml Bidest und 2,15g Natrium-Meta-Perjodat in 4ml Bidest getrennt unter Erwärmung gelöst und dann erst in einen 50ml-Kolben gegeben, gemischt und mit Bidest auf 50ml aufgefüllt. (0,2 molare Perjodatlösung in 9 molarer Phosphorsäure).
Lösungen nach WARREN II: 10g Natrium-Meta-Arsenit + 7,1g Natriumsulfat werden mit 280 µl 96%iger Schwefelsäure versetzt und ad 100ml mit Wasser gelöst (10%iges Natriumarsenit in einer Lösung aus 0,5 molarem Natriumsulfat - 0,1 N Schwefelsäure.
Lösungen nach WARREN III: 14,2g Natriumsulfat + 1,2g Thio-Barbitursäure werden ad 200ml mit Bidest unter langsamem Erwärmen gelöst (0,6%ige Thio-Barbitursäure in 0,5 molarem Natriumsulfat).
Die Lösungen wurden bei Raumtemperatur gelagert und alle 14 Tage neu hergestellt.

b) Versuchsablauf:

1ml Serum wurde mit 7ml 0,1143 N Schwefelsäure im Schliff-Reagenzglas gemischt, das Reagenzglas gut verschlossen und bei 80°C für 1 Std. inkubiert. Danach wurde mit 0,11 N Natronlauge die Neutralisation bis auf einen pH-Wert zwischen 6,5 und 7 vorgenommen. Das ausgefällte Material wurde zweimal 5 min mittels einer Laborzentrifuge bei 2000g abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die Neuraminsäurebestimmung eingesetzt.

200 µl Überstand wurden mit 100 µl WARREN-I-Lösung bei Raumtemperatur gemischt und 20 min stehengelassen. Danach wurde 1ml Arsenit-Lösung (WARREN-II) hinzugegeben und die Reagenzgläser so lange geschüttelt, bis ein gelb-brauner Niederschlag sich wieder auflöste. Ohne die Bildung dieses Niederschlages ist die Bestimmung fehlerhaft, und man muß oft über längere Zeit hinweg schütteln. Schließlich werden die Thio-Barbitursäurelösung in einer Menge von 3ml hinzugegeben, die Reagenzgläser geschüttelt sowie gut verschlossen und 15 min lang in einem heftig kochenden Wasserbad erhitzt. Danach werden die Reagenzgläser 5 min lang in eiskaltes Wasser gestellt. Während des Abkühlens verschwindet oft ein roter Farbniederschlag und die Lösung wird trübe. Dies beeinträchtigt jedoch nicht die Bestimmung. Die gesamten 4,3ml des Versuchsansatzes werden in ein gleiches Volumen Cyclohexanon gegeben und zweimal hintereinander kräftig geschüttelt. Danach wird die Suspension 5 min lang bei 3.000g zentrifugiert.

Das Chromogen befindet sich in der klaren oberen Cyclohexanonphase.

Die Extinktion wurde im Photometer bei den Wellenlängen 549 und 532nm gegen einen Leerwert gemessen, bei dem die ganze Bestimmung, anstelle mit Serum, mit Wasser durchgeführt wurde.

Die Schichtdicke der Küvetten betrug 1cm.
Wegen der Interferenz der Neuraminsäurebestimmung durch 2-Desoxyribose mußte die Bestimmung bei 2 Wellenlängen durchgeführt werden.
Der mikromolare Extinktionskoeffizient von Neuraminsäure betrug bei der Wellenlänge 532nm 26; bei der Wellenlänge 549nm 57. Der mikromolare Extinktionskoeffizient für Desoxyribose beträgt bei 532nm 133; bei 549nm 48.
Die Gesamtextinktion bei den Wellenlängen 532 bzw. 549nm setzt sich aus den Teilextinktionen für Neuraminsäure und Desoxyribose bei diesen Wellenlängen zusammen. Bezeichnet man daher die Gesamtextinktion mit O-ξ sowie die Teilextinktion der Neuraminsäure mit ON und die der Desoxyribose mit OD, so ergibt sich die Beziehung der Formeln I bzw. II:

I $\quad O\xi_{549} = ON_{549} + OD_{549}$

II $\quad O\xi_{532} = ON_{532} + OD_{532}$

Hierbei bezeichnen die Indizes die Wellenlänge.
Experimentell sind nur die Gesamtextinktionen meßbar. Aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz $E = \xi \cdot c \cdot d$ ergibt sich für die Bestimmung der Konzentration in μmol/ml $c = \frac{E}{\xi \cdot d}$

Hieraus ergibt sich für die Konzentration der Neuraminsäure

$$c_N = \frac{ON_{549}}{\xi 2} = \frac{ON_{532}}{\xi 1}$$

Ferner ergibt sich für die Konzentration der Desoxyribose

$$c_D = \frac{OD_{549}}{\xi 4} = \frac{OD_{532}}{\xi 3}$$

Löst man diese Formeln nach den Extinktionen auf, so ergibt sich IV:

$$^{O}\varepsilon_{549} = \varepsilon 2\ c_N + \varepsilon 4\ c_D$$

V: $$^{O}\varepsilon_{532} = \varepsilon 1\ c_N + \varepsilon 3\ c_D$$

Löst man Formel V nach c_D auf, so ergibt sich

VI: $$\frac{^{O}\varepsilon_{532} - \varepsilon 1\ c_N}{\varepsilon 3} = c_D$$

aus IV folgt VII:

$$\frac{^{O}\varepsilon_{549} - \varepsilon 4\ c_D}{\varepsilon 2} = c_N$$

aus VII, unter Einsetzung von c_D, aus Formel IV, ergibt sich:

$$c_N = \frac{^{O}\varepsilon_{549}}{\varepsilon 2} - \left[\frac{\varepsilon 4 \cdot (^{O}\varepsilon_{532} - \varepsilon 1\ c_N)}{\varepsilon 3 - \varepsilon 2}\right]$$

Nach weiterer Umformung ergibt sich schließlich für c_N folgende Formel:

$$c_N = \frac{^{O}\varepsilon_{549} \cdot \varepsilon 3}{\varepsilon 2 \cdot \varepsilon 3 - \varepsilon 1 \cdot \varepsilon 4} - \frac{^{O}\varepsilon_{532} \cdot \varepsilon 4}{\varepsilon 2 \cdot \varepsilon 3 - \varepsilon 1 \cdot \varepsilon 4}$$

Unter Zugrundelage der mikromolaren Extinktionskoeffizienten $\varepsilon_1 = 26$ $\varepsilon_2 = 57$ (Neuraminsäuren) sowie $\varepsilon_3 = 133$ und $\varepsilon_4 = 48$ (Desoxyribose) ergibt sich als Formel für die Bestimmung der Neuraminsäure unter Berücksichtigung der Störextinktion im Bereich der gemessenen Wellenlänge 549nm:

$$c_N = {}^{O}\varepsilon_{549} \cdot 0{,}021 - {}^{O}\varepsilon_{532} \cdot 0{,}00758 \quad (\mu\text{Mol/ml Ansatz})$$

Diese Formel muß noch mit 4,3 multipliziert werden, um die Menge Neuraminsäure zu erhalten, die in der ursprünglich eingesetzten Probe von 200 µl enthalten ist. Hierdurch ergibt sich, unter Berücksichtigung der Verdünnung des Serums 1 : 8 sowie der Neutralisationsmenge (2ml 0,11 N Natronlauge + 500 µl 1 N Natronlauge) für 1ml Serum die endgültige folgende Formel:

$$c_N = \left[0{,}09 \cdot OD_{549} - 0{,}033 \cdot OD_{532} \right] \cdot 5 \cdot \frac{10{,}5}{8{,}0} \cdot \frac{8}{1} \left[\frac{\mu Mol/ml}{Serum} \right]$$

Bestimmung von saurem α_1-Glycoprotein

Die Auftragsstellen 1 - 3 der M-Partigen-Platten wurden mit je 5 µl der Standardverdünnungen 1 : 4, 1 : 2, 1 : 1 = unverdünnt mit dem Dispenser gefüllt. Die Verdünnung des Standard-Human-Serums wurde mit physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt. Die restlichen 9 Auftragsstellen wurden mit 1 : 2 verdünntem Patientenserum beschickt. Das Probevolumen betrug ebenfalls 5 µl. Nach dem Beschicken der Platten wurden dieselben verschlossen für 2 Tage bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Nach Erreichen des Endpunktes der Diffusion wurden die Durchmesser der Präzipitatringe mit einer Meßlupe auf 0,1mm genau ausgemessen. Die Ringdurchmesser wurden quadriert und diejenigen der Standardverdünnungen auf linearem Millimeterpapier als Funktion der Konzentration aufgetragen. (Abszisse: Antigenkonzentration in mg/100ml, Ordinate: Quadrate der Ringdurchmesser im mm^2). Hierdurch ergab sich eine Eichgerade, deren Schnittpunkt mit der Ordinate zwischen 8 und 13mm^2 lag. Die Konzentration des jeweiligen Probeserums ergab sich unmittelbar durch Ablesen der Geraden. Der hierbei erhaltene Wert mußte wegen der vorausgegangenen Verdünnung mit 2 multipliziert werden.

Statistik: Aus den zu einer Gruppe gehörenden Meßwerten wurde der Mittelwert mit Varianz und Standardabweichung bestimmt.
Die Prüfung auf Signifikanz zwischen 2 Gruppen wurde mit dem T-Test nach STUDENT nach der 2seitigen Hyphothese auf dem 95%-Signifikanz-Niveau durchgeführt. Hierbei gingen in die Bestimmung die Anzahl der Stichproben pro Gruppe, die Standardabweichungen und Mittelwerte ein. Der hierbei bestimmte T-Wert wurde mit den Grenz-T-Werten aus Tabellen (z.B. in GEIGY-Tabellen) verglichen.

III. ERGEBNISSE

Die Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der Neuraminsäure-Bestimmung im Serum von 15 gesunden, nicht tumortragenden Kontrollpersonen beiderlei Geschlechts ohne bekannte Lungenerkrankungen.

Tabelle 2

Extinktionen		
Wellenlänge 549nm	Wellenlänge 532nm	µmol/ml Serum
0,623	0,286	2,400
0,621	0,265	2,065
0,590	0,246	1,968
0,550	0,249	1,806
0,640	0,210	2,217
0,640	0,260	2,145
0,610	0,287	1,987
0,590	0,224	2,009
0,670	0,295	2,212
0,565	0,210	1,921
0,630	0,255	2,112
0,600	0,205	2,066
0,579	0,195	1,998
0,716	0,300	2,386
0,623	0,222	2,132

Der Mittelwert dieser Gruppe beträgt 2,095 µmol/ml Serum, die Standardabweichung 0,163. Dieser Wert liegt, trotz Berücksichtigung der Störextinktion, signifikant höher als die von verschiedenen Autoren angegebenen Mittelwerte, die um 1,7 µmol/ml mit einer Standardabweichung von 0,2 liegen.

Tabelle 3 zeigt die von uns im Serum gemessenen, durch Hydrolyse freigesetzten Neuraminsäure-Werte bei 13 Patienten mit Bronchial-Carcinomen:

Tabelle 3

Extinktionen		
Wellenlänge 549nm	Wellenlänge 532nm	µmol/ml Serum
0,995	0,390	3,355
1,270	0,475	4,318
0,750	0,335	2,358
1,050	0,450	3,485
1,050	0,385	3,579
1,000	0,375	3,399
1,040	0,430	3,474
1,630	0,660	5,465
0,910	0,403	3,002
0,900	0,370	3,010
1,100	0,481	3,637
1,100	0,445	3,689
0,980	0,370	3,324

Der Mittelwert dieser Gruppe beträgt 3,545 µmol/ml Serum. Die Standardabweichung 0,73.

Als Patienten wurden nur Fälle mit histologisch gesichertem inoperablen Bronchial-Carcinom (verhornendes oder nichtverhornendes, klein- und großzelliges Carcinom) ausgewertet. Eine Stadieneinteilung wurde nicht vorgenommen, da ausschließlich ausgedehnte Spätstadien untersucht wurden, z.T. mit Lebermetastasen, um festzustellen, ob eine Neuraminsäure-Erhöhung unter diesen eindeutigen Bedingungen vorliegt.

Von anderen Autoren (Watkins, 1974) werden ebenfalls Erhöhungen der serumgebundenen Sialinsäuren, in Abhängigkeit

von der Tumorausdehnung, beschrieben, wobei der Mittelwert der Gruppe mit ausgedehnten Tumoren bei 2,73 lag. Die Patientengruppe mit operativ resezierten Tumoren hatte eine Neuraminsäure-Erhöhung geringeren Ausmaßes.

Die Tabelle 4 zeigt unsere Meßergebnisse der Bestimmung der serumgebundenen Sialinsäure bei Patientinnen mit Mamma-Carcinom. Es wurden nur solche Patientinnen berücksichtigt, bei denen eine histologische Sicherung der Diagnose vorlag und bei denen zum Zeitpunkt der Blutentnahme unzweifelsfrei Tumorgewebe vorlag.
Es handelt sich daher um Patientinnen, bei denen entweder primär eine Palliativbestrahlung bei bekannten Metastasen durchgeführt werden sollte oder um Patientinnen, die nach erfolgter Strahlenbehandlung im Laufe der weiteren ambulanten Kontrollen Fernmetastasen entwickelten. Die Fernmetastasierung wurde röntgenologisch, szintigraphisch und laborchemisch objektiviert.

Tabelle 4

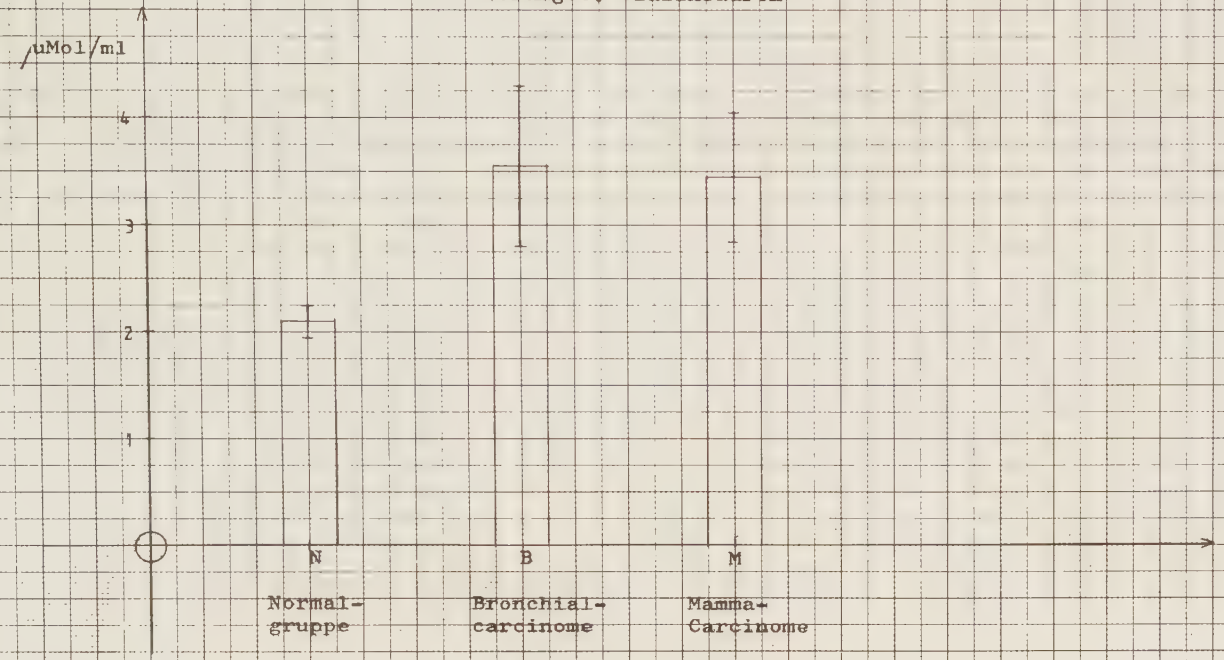
Extinktionen

Wellenlänge 549nm	Wellenlänge 532nm	µMol/ml Serum
0,915	0,385	3,029
0,959	0,405	3,173
0,819	0,348	3,525
0,954	0,395	3,168
1,160	0,483	3,848
0,804	0,341	2,658
0,615	0,269	2,021
0,919	0,401	3,022
1,170	0,491	3,816
1,320	0,568	4,354
1,290	0,535	4,285
1,250	0,550	4,128
1,150	0,470	3,850
0,825	0,325	2,759
1,150	0,320	4,066
0,910	0,365	3,548
1,070	0,440	3,579
0,950	0,405	3,287

Der Mittelwert dieser Gruppe beträgt 3,451 µmol/ml Serum mit einer Standardabweichung von 0,619. Er liegt damit signifikant über dem Mittelwert der Kontrollgruppe.

Abb. 1

Serumgeb. Sialinsäuren



Aus den vorangehenden Tabellen ist ersichtlich, daß bei Tumorpatienten mit histologisch gesichertem Bronchial- bzw. Mamma-Carcinom eine Erhöhung der serumgebundenen Sialinsäurekonzentration nachweisbar ist.
Da bei Infektionen im Lungen-Bronchial-Bereich ebenfalls eine Erhöhung der Sialinsäurekonzentration im Serum nachweisbar ist, könnte man bei alleiniger Betrachtung der Gruppe der Bronchial-Carcinome einwenden, daß die dort nachweisbare Erhöhung der Serum-Sialinsäuren durch die häufig hierbei zu beobachtende Begleitinfektion, z.B. i.S. einer dystelektatischen Pneumonie zu erklären ist. Hiergegen sprechen eindeutig die Befunde in der Gruppe der Mamma-Carcinome, die zumindest bei den von uns untersuchten Stadien IV mit Fernmetastasen ebenfalls deutliche Erhöhungen der Sialinsäure-Konzentration aufwiesen.
Unsere Bestimmungen bei Tumorpatienten anderer Organlokalisation ergaben ebenfalls deutlich erhöhte Sialinsäure-Konzentration im Serum. Wir haben diese Gruppe jedoch nicht statistisch berücksichtigt, da es sich hierbei um Patienten handelt, die postoperativ zur Strahlentherapie überwiesen worden waren.
Hierbei ließ es sich retrospektiv nicht mehr sicher eruieren, ob zum Zeitpunkt der Blutentnahme noch Tumorgewebe vorhanden war.
Andererseits hat WATKINS (1974) nachgewiesen, daß auch bei tumorresezierten Patienten eine Erhöhung der Konzentration der Sialinsäure im Serum besteht.
Wir vermuteten zunächst, daß ein neuraminsäurehaltiges Glycoproteid des Serums bei Tumorpatienten in erhöhter Konzentration vorliegt. Der quantitativ größte Anteil der serumgebundenen Neuraminsäure wird durch Alpha-1-Glycoproteid bedingt.
Wir untersuchten daher die Konzentrationswerte dieses Serumproteids, um festzustellen, ob die Erhöhung der Sialin-

säure-Konzentration im Serum von Tumorpatienten hierdurch bedingt ist. Die mit den von uns verwendeten Partigen-Platten bei Kontrollpersonen ermittelten Normalwerte des sauren Alpha-1-Glycoproteids liegen zwischen 55 und 140mg%.

Tabelle 5 zeigt die Serumwerte des α1-Glycoproteins von 40 Tumorpatienten.

Tabelle 5

a) Mamma-Carcinome:

D mm	D^2 mm	mg%
5	25	75,7
5,3	28,09	89,84
5,3	28,09	89,84
5,5	30,25	99,7
6	36	126
6,1	37,21	131,52
6	36	126
4,4	19,36	49,92
5,4	29,16	94,72
5,6	31,36	104,78

Der Mittelwert dieser Gruppe beträgt 98,8 mg%; die Standardabweichung beträgt 25,13.

b) Bronchial-Carcinome:

D mm	D^2 mm	mg%
5,6	31,36	104,78
6,4	40,96	148,66
8,4	70,56	283,98
6,7	44,89	166,64
5,8	33,64	115,2
6,9	47,61	179,06
9,9	98,01	409,46
5,9	34,81	120,56
5,1	26,01	80,32

Der Mittelwert dieser Gruppe liegt bei 178,74mg%; die Standardabweichung beträgt 104,8.
Obwohl somit der Mittelwert der Gruppe der Bronchial-Carcinome deutlich über dem der Mamma-Carcinome bzw. über dem der Kontrollgruppe liegt, ergibt sich insgesamt infolge der großen Streuung keine signifikante Abweichung vom Normalwert.

c) Die Untergruppe c) zeigt die Serumwerte von α1-Glycoprotein bei Tumorpatienten unterschiedlicher Histologien, deren Fallzahl jedoch zu klein war, um gesondert zu einer statistisch verwertbaren Gruppe zusammengefaßt zu werden.

D mm	D^2 mm	mg%
6,2	38,44	137,15
5	25	75,7
5,5	30,25	99,7
4,7	22,09	66,4
5,4	29,16	94,72
5	25	75,7
5,5	30,25	99,7
5,2	27,04	85,04
6,3	39,69	142,86

Der Mittelwert dieser Gruppe beträgt 94,44mg%; die Standardabweichung beträgt 26,93.

d) Die Untergruppe d) zeigt die Serumwerte von α1-Glycoprotein von Patienten mit histologisch gesichertem Tumorleiden, bei denen sich jedoch retrospektiv die Histologie nicht mehr feststellen ließ.

D mm	D^2 mm	mg%
4,4	19,36	49,92
5,7	32,49	109,9
8,6	73,96	299,52
4,7	22,09	62,4
5,4	29,16	94,72
5,2	27,04	85,04
6,9	47,61	179,06
5,5	30,25	99,7
5,3	28,09	89,84
5	25	75,7
5	25	75,7
5,3	28,09	89,84

Der Mittelwert liegt in dieser Gruppe bei 113,03mg%; die Standardabweichung beträgt 68.

Die statistische Auswertung der verschiedenen Tumorgruppen ergibt keine statistisch signifikante Abweichung der Mittelwerte der einzelnen Gruppen von dem der Kontrollgruppe. Bei der Gruppe der Bronchialcarcinome findet sich zwar fast eine Verdoppelung des Mittelwertes, jedoch ist die Standardabweichung infolge der großen Schwankung der Einzelwerte sehr groß.
Auf den nachfolgenden 2 Abbildungen sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Gruppen für die serumgebundene Sialinsäure sowie das saure χ 1-Glycoprotein getrennt dargestellt.

Legende zu Abb. 2:

N = Normalgruppe

M = Mamma-Carcinome

B = Bronchial-Carcinome

T_1 = Tumorgruppe mit bekannter Histologie, aber zu kleiner Fallzahl

T_2 = Tumorgruppe mit bekannter Histologie, retrospektiv aber nicht mehr genau eruierbarer Histologie

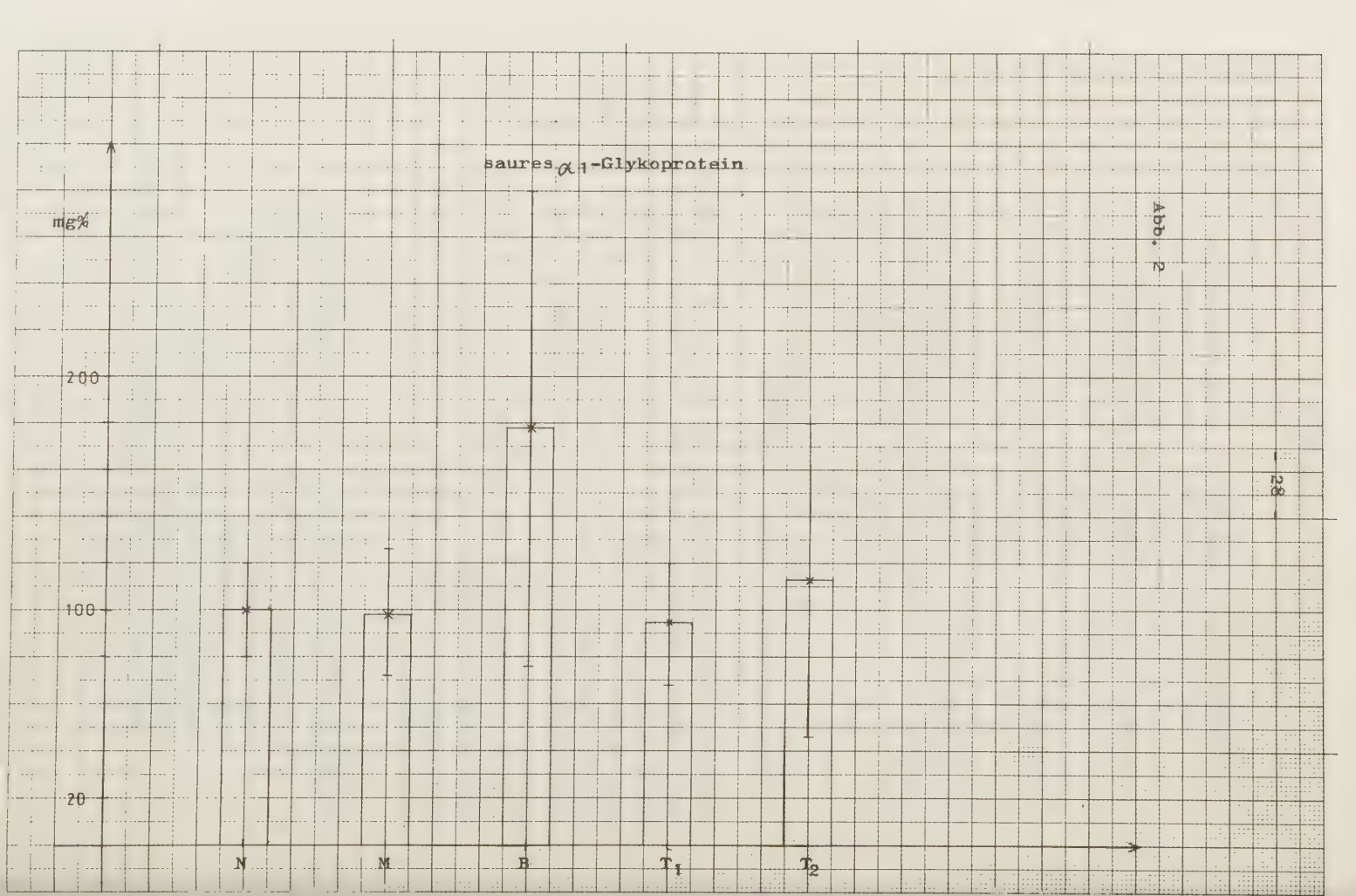


Abb. 2

IV. DISKUSSION

Die Rolle der Sialinsäuren am Aufbau der Glycoproteide und Glycolipide ist ungeklärt. Es gibt lediglich indirekte Hinweise, die meistens aus den Ergebnissen der Abspaltung der Neuraminsäuren durch Neuraminidase hervorgehen. Als wesentliche Wirkungen, die durch die Abspaltung von Neuraminidase hervorgerufen werden, ist eine Steigerung der Immunogenität von Antigenen, eine Änderung der elektronegativen Ladung der Zelle mit Steigerung der Deformierbarkeit derselben und einer erhöhten Aggregationsneigung zu nennen. Ferner wird die biologische Halbwertszeit durch Abspaltung der Neuraminsäure vermindert. (SEDLACEK, 1977).

Der Erhöhung der Neuraminsäure im Serum von Tumorkranken kommt daher eine direkte Beziehung zur Immunlage des Tumorwirtes zu. Insbesondere zeigen die bei uns vorliegenden Ergebnisse, daß diese Erhöhung nicht so sehr von der Histologie des Tumors als vielmehr von der Tumormasse abhängt. In Anbetracht der Immunparalyse bei fortgeschrittenem Tumorleiden kann daher angenommen werden, daß neuraminsäurehaltige Glycoproteide durch den Tumor in die Zirkulation sezerniert werden (WATKINS, 1974), ein Vorgang, der durch die negative arterio-venöse Differenz im Tumorgefäßbett experimentell bestätigt werden konnte. Hierbei zeigen unsere Ergebnisse, daß nicht die vermehrte Bildung von α_1-saurem Glycoprotein durch den Tumor die erhöhten Werte der Sialinsäure im Serum nach saurer Hydrolyse bedingt. Vielmehr ist anzunehmen, daß die Tumorzellen neuraminsäurereiche tumorspezifische oder fötale Glycoproteine bilden, gegen die der Wirt keine oder nur eine unzureichende Immunantwort aufbauen kann. Die erhöhten Werte der serumgebundenen Sialinsäure bei Tumorpatienten sind daher der Ausdruck

der tumorbedingten Immunparalyse des Tumorträgers. Konsequenterweise sollte es daher durch Abspaltung der Neuraminsäure mittels des Enzyms Neuraminidase möglich sein, die Immunogenität des Tumorgewebes zu steigern. Entsprechende Versuche sind in neuerer Zeit mit überwiegend positivem Erfolg durchgeführt worden (SEDLACEK, 1977, BEKESI, 1976).
So berichteten LINDEMANN und KLEIN (1967), SANFORD (1967) und CURRIE (1967) über eine Verminderung der Transplantierbarkeit von Tumoren nach Behandlung der Tumorzellen durch Neuraminidase. Dieser Effekt konnte zurückgeführt werden auf eine Verstärkung der Immunogenität der behandelten Tumorzellen. Der Erfolg einer solchen Tumor-Immuntherapie war nur möglich bei erhaltener Enzymaktivität und bei zusätzlicher Reduktion der Tumormasse durch vorangehende Tumorchirurgie oder Chemotherapie, wobei letztere keine zu starke Immunsuppression hervorrufen durfte.
Der Wirkung der Neuraminidase-Therapie liegen möglicherweise verschiedene Effekte zugrunde. U.a. wird diskutiert, daß durch die Abspaltung der Neuraminsäure tumorspezifische Transplantationsantigene und Neoantigene freigelegt werden. Ferner soll durch die Erniedrigung der negativen Zelladung die Größe der Energiepotential-Barrieren reduziert werden, die den Zell-zu-Zell-Kontakt verhindern. Hierdurch soll die Zelladhärenz und Zellaggregation erhöht werden, die ihrerseits die Phagozytose durch Makrophagen stimuliert.

Andererseits konnte gezeigt werden, daß sich bei der Inkubation mit Neuraminidase dieselbe fest mit Rezeptoren der Zellmembran verbindet, wobei die Enzymaktivität, gemessen an der Freisetzung von Sialinsäure aus α_1-saurem Glycoprotein, erhalten bleibt. In ähnlicher Weise kann sich die Neuraminidase auch an andere Antigene oder Mikroorganismen festbinden und als Enzym mit einer makromolekularen Trä-

germatrix betrachtet werden (LEE, 1968, WEISS, 1971, CORMAK, 1970, SEDLACEK, 1977, LÜBEN, 1976, JOHANNSEN, 1976).

Auf diese Weise ist es der Matrixzelle oder dem Matrixantigen möglich, mit neuraminsäurehaltigen Substraten zu reagieren, insbesondere auch an der Oberfläche von Lymphozyten. Hierbei ist es von Interesse, daß die Wirkung der Neuraminidase auf Lymphozyten zu einer Steigerung der blastogenen Immunantwort dieser Zellen auf spezifische Antigene führt. Die Wirkung des Enzyms ist beschränkt auf die killer-cells oder, ganz allgemein, die respondierenden Zellen, nicht jedoch auf unstimulierte Lymphozyten.

Ferner konnte JOHANNSEN (1974) nachweisen, daß es humane Autoantikörper gibt, die gegen neuraminidasebehandelte Zelloberflächen gerichtet sind. Dieser Effekt beruhte auf der erhaltenen Enzymaktivität der Neuraminidase, möglicherweise durch Stimulierung der blastogenen Reaktion spezifischer Lymphozyten oder durch Steigerung der Phagozytoseaktivität von Makrophagen.

Dieser Adjuvanzeffekt von membrangebundener Neuraminidase wurde insbesondere von SEDLACEK (1977) intensiver untersucht. Als Ausgangsbeobachtung diente hierzu die Tatsache einer strengen Dosisabhängigkeit der Wirkung einer Immuntherapie mit Neuraminidase. Insbesondere fand sich keine Korrelation zwischen Tumorregression und abgespaltener Sialinsäuremenge. Es konnte gezeigt werden, daß Neuraminidase an der äußeren Zellmembran von normalen und Tumorzellen in enzymatisch aktiver Form nach der Inkubation vorliegt. Die intramuskuläre Injektion von Erythrozyten, die mit Neuraminidase inkubiert worden waren, führte zu einer qualitativ und quantitativ ähnlichen Zellinfiltration im Sinne einer lokalen entzündlichen Reaktion, wie die Injektion von Erythrozyten ohne Neuraminidase. Die

Entzündungsreaktion setzte jedoch früher ein.
Ferner führt die Injektion von Neuraminidase zusammen mit zellulären-, bakteriellen-, viralen- oder Protein-Antigenen in vivo zu einer verstärkten humoralen Antwort und stimuliert daneben auch die Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ gegenüber Zellen und durchbricht die Immuntoleranz körpereigener Proteine, z.B. des Albumins. Insbesondere interessant für die Tumortherapie sind Beobachtungen von JOHANNSEN, 1976, daß die Zugabe steigender Dosen von Neuraminidase (0,05 - 5 U) die DNS-Synthese in der gemischten Lymphozytenkultur auf das 2- bis 5-fache erhöhte. Diese Verstärkung der blastogenen Reaktion der Lymphozyten konnte ebenso durch die Zugabe von 5 U Neuraminidase zu neuraminsäurefreien Antigenen (Tetanustoxoid, Röteln-Virus, Influenza-Virus) erreicht werden, wobei die enzymatische Aktivität eine Vorbedingung für die Verstärkung ist.
Eine verstärkte Phagozytose-Aktivität durch Makrophagen kann durch vorhergehende Injektion von Neuraminidase in die Bauchhöhle von Versuchsmäusen durch eine verstärkte Clearance lebender E. coli-Zellen nachgewiesen werden. Offensichtlich wird durch die enzymatische Wirkung der Neuraminidase auf immunkompetente Zellen und Antigene eine Verstärkung des Erkennungsprozesses bewirkt.

Die Behandlung von Tumorzellen oder auch normalen Zellen wie z.B. Lymphozyten mit Neuraminidase führt zu einer Änderung ihrer Organotropie. Diese Wirkung teilt die Neuraminidase mit anderen Enzymen wie z.B. Proteasen und Glycosidasen. Ferner ist es aus Arbeiten von HAKOMORI, (1971) bekannt, daß bei bestimmten Tumoren die Anheftung der Neuraminsäure an das nichtreduzierende Ende der Oligosaccharidseitenketten von Glycolipiden und Glycoproteinen nicht mehr möglich ist. Dadurch wird das nichtreduzierende Ende

der Seitenkette, meistens Galaktose, und N-Azetylgalactosamin, immundeterminant. So ist es nicht verwunderlich, daß T-reaktive Antigene in Zellmembranen von Human- und Mäusebrustcarcinomen durch SPRINGER und Mitarbeiter, [(1974) und (1975 a, b, c,)] ; nachgewiesen werden konnten, da ja das T-Antigen Galactose als Immundeterminante besitzt.
Von anderen Autoren (ROGENTINE, 1974); wurde dieser Mechanismus der Entstehung von Neo-Antigenen defekter Zellen zur molekularbiologischen Deutung der Immunüberwachungshypothese nach BURNET, (1957); herangezogen. Gegen diese Neo-Antigene bestehen normalerweise Auto-Antikörper, wahrscheinlich als Immunantwort gegen Kohlenhydratantigene von Mikroorganismen.
Bei der neoplastischen Transformation der Zellmembran oder auch bei der Zellyse entstehen diese Antigene, die dann eine booster-Immunreaktion der humoralen und zellulären Art induzieren, und so zur Entfernung der neoplastischen Zellen führen.

Tumortransplantationsexperimente von SANFORD, (1967); und LINDEMANN (1967) ergaben, daß die vorhergehende Injektion neuraminidasebehandelter Tumorzellen die Versuchstiere in einem hohen Prozentsatz vor einer nachfolgenden hochdosierten Überimpfung lebender, nichtbehandelter Tumorzellen spezifisch schützt.
Ferner konnte gezeigt werden, daß die Injektion neuraminidasebehandelter Lymphozyten, Milzzellen oder Knochenmarkszellen eine verstärkte Abstoßungsreaktion syngener Hauttransplantate (IM, 1971) bei Mäusen bewirkte.
In weiteren Tumor-Therapieexperimenten mit Neuraminidase wurde besonders darauf hingewiesen, daß für die Wirksamkeit dieser Therapieform ein halbwegs intaktes Immunsystem erforderlich ist. Jedesmal dann, wenn durch ein weit fortgeschrittenes Tumorwachstum eine ausgedehnte Bestrahlung

oder eine radikale Poly-Chemotherapie eine Immunparalyse des Wirtes besteht, ist auch eine Neuraminidase-Therapie wirkungslos. Eine alleinige Neuraminidase-Therapie von experimentellen Tiertumoren ohne vorhergehende Reduktion der Tumorzellmasse durch Chirurgie oder durch vorsichtige zytostatische Therapie erwies sich als wirkungslos. (FRÖSE, 1974), (SEDLACEK, 1974), (RIOS, 1974), (PORWIT-BOBR, 1974).
Dies konnte insbesondere durch die Arbeiten von WILSON (1974) klargestellt werden.
MATHÉ (1973) fand keinen Unterschied zwischen Chemotherapie und Chemo-Immuno-Therapie hinsichtlich der Mortalität der Mäuse-Leukämie. Im Gegensatz hierzu wandte BEKESI nur eine mäßig immunsuppressive Poly-Chemo-Therapie mit Cytosin-Arabinosid (100mg/m^2/ Tag) intravenös an 7 aufeinanderfolgenden Tagen und zusätzlich am 1., 2. und 3. Tag Daunorubicin in einer Dosis von 45mg/m^2 an und konnte deutliche Verbesserungen der remissionsfreien Zeiten sowie der Überlebenszeit bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie durch wiederholte Immunisierung mit neuraminidasebehandelten allogenen Myeloblasten erreichen. (Bekesi, 1977). Diese Chemotherapie führte bei 70% der Patienten zu einer Remission. Die Erhaltungs-Chemo-Therapie wurde alle 4 Wochen durchgeführt, wobei das AraC während 5 Tagen alle 12 Stunden in einer Dosis von 100mg/m^2 i.v. appliziert wurde. Zusätzlich wurden sequentiell 6-Thioguanin, Cyclophosphamid, CCNU oder Daunorubicin verabreicht.
Für die Immuntherapie mit Neuraminidase wurden allogene leukämische Zellen von unbehandelten Patienten mit akuter myeloischer Leukämie durch Leukopherese verwendet. Diese wurden unmittelbar vor der Therapie mit Neuraminidase behandelt und den Patienten an 48 Stellen im Bereich des supraclavicularen, infraclavicularen, parasternalen, supra-

inguinalen, femoralen, lateral-thorakalen Bezirks, ferner im Bereich des Ober- und Unterarmes intradermal injiziert. Die Immuntherapie wurde in monatlichen Abständen wiederholt. Pro Sitzung wurden 10^{10} Zellen verabreicht.
Unter dieser Therapieform erreichte man eine Remissionsrate von 85%. Bei 22 von 27 Patienten bestand die erste Remissionsphase schon seit 75 - 170 Wochen. Die Remissionsdauer der 5 Patienten mit erneuter Erkrankung betrug zwischen 30 und 81 Wochen. Bei diesen 5 Patienten konnte relativ leicht eine weitere Remission erzielt werden.
Bei den 25 Patienten mit alleiniger Chemotherapie dauerte die mittlere Remissionszeit 20 Wochen. Ferner konnte eine zweite Remission kaum erreicht werden.
Die Überlebensrate der Patienten mit Chemo-Immuno-Therapie war deutlich besser (22 v. 27 Patienten) als diejenige der Patienten mit alleiniger Chemotherapie. (8 v. 28 Patienten).

Bei Patienten mit Chemo-Immuno-Therapie fand sich eine deutlich verstärkte kutane verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion gegen Candida, Mumps, PPD etc. Die T- und B-Lymphozytenfunktion der immunbehandelten Patienten wurde in vitro durch Induktion der Lymphozytenblastogenese mit PHA (Phytohämagglutinin) bzw. PWM ("pokeweed"mitogen) getestet. Diese war bei der Immungruppe deutlich höher als bei der Kontrollgruppe mit alleiniger Chemotherapie.

SEIGLER (1972) und ROSATO (1974, 1976) behandelten Patienten mit malignem Melanom in 4 Phasen bei Tumorrezidiv nach vorhergehender chirurgischer, radiologischer und chemotherapeutischer Behandlung. Die ersten drei Phasen bestanden in einer Immunotherapie mit BCG. Von 22 Patienten erreichten nur 7 die Phase IV, in der den Patienten bestrahlte, neuraminidasebehandelte autologe Tumorzellen und BCG subkutan verabreicht wurde. Von diesen ausbehandelten Pa-

tienten mit deutlicher Immunsuppression infolge der vorhergegangenen Behandlungsschemata wiesen 6 eine komplette Regression ihrer Erkrankung während eines Beobachtungszeitraumes von 6 - 30 Monaten auf.
ROSATO (1974) injizierte 5 x 10^6 neuraminidasebehandelte, bestrahlte, autologe Tumorzellen 25 Patienten intramuskulär 6 Monate lang in monatlichen Abständen. Diese Patienten wurden wegen der fortgeschrittenen Ausdehnung ihres Tumorleidens und dem Versagen anderer Therapieformen in die Studie aufgenommen. Die Mehrheit der Patienten besaß daher eine ausgedehnte Tumormasse, die durch Chirurgie oder Chemotherapie oder Bestrahlung nicht verkleinert werden konnte. Trotzdem überlebten 6 dieser 25 Patienten während eines Beobachtungszeitraumes von mehr als 8 Monaten ohne Hinweis auf Tumorprogression. Diese Patienten zeigten eine verstärkte zellvermittelte Zytotoxizität gegen autologe Zielzellen. Aufgrund dieser Resultate dehnte ROSATO (1976) seine Studie auf 45 Patienten aus, die nach chirurgischer Tumorresektion im wesentlichen mit dieser Immuntherapie behandelt wurden. Von 9 Patienten mit Brustkrebs (4 Stadium I - II, 3 Stadium III, 2 Stadium IV) blieben 7 während eines Beobachtungszeitraumes von 10 - 17 Monaten rezidivfrei, während 2 (Stadium IV mit Hautmetastasen und Vorbestrahlung sowie Stadium III) 17 bzw. 18 Monate nach der Operation ein Rezidiv entwickelten. Drei Patienten mit Gastrointestinaltumoren, davon 2 mit Colon-Carcinom (einer davon mit Befall aller Wandabschnitte, einer mit Lebermetastasen) und einer mit Magen-Carcinom blieben während einer Beobachtungszeit von 14 - 24 Monaten rezidivfrei.
Von 5 Patienten mit Hautkrebs, davon 4 mit malignem Melanom, einer mit metastasierendem Plattenepithelcarcinom, verstarb der letztere trotz Immuntherapie nach 4 Monaten, wobei zu erwähnen ist, daß dieser Patient zusätzlich bestrahlt worden war und mehrere Cyclen einer Chemotherapie erhielt. Die

übrigen 4 Patienten blieben tumorfrei über einen Beobachtungszeitraum von 9 - 32 Monaten. Vier weitere Patientinnen mit Genitaltumoren verstarben alle innerhalb 1 - 15 Monaten, wobei allerdings wieder erwähnt werden muß, daß sie zusätzlich postoperativ bestrahlt wurden und eine Chemotherapie erhielten. Der klinische Verlauf der Krankheit korrelierte bei diesen Patienten mit der Lymphozytentoxizität gegen autologe Tumorzellen. Auch aus diesen klinischen Studien geht hervor, daß eine Immunsuppression des behandelten Patienten durch vorangegangene aggressive Bestrahlungen und Chemotherapie sowie eine große Tumorzellmasse eine nachfolgende Immuntherapie beeinträchtigen.

Die wesentlichen Kriterien für die Immuntherapie mit Neuraminidase ergeben sich aus den Versuchen von SEDLACEK (1977) an spontan auftretendem Mamma-Carcinom bei Hunden.
Hierbei existieren histologische Ähnlichkeiten zwischen Mamma-Carcinom bei Hunden und Menschen, sowie auch enge Parallelen im biologischen Verhalten der Tumoren.
Hunde, die mindestens 2 Mamma-Tumoren aufwiesen, wurden in die Studie aufgenommen. Der eine Tumor wurde entfernt zur histologischen Sicherung der Diagnose und zur Präparation einer Einzelzellsuspension. Der andere Tumor wurde im Tier belassen zur Beobachtung des Therapieerfolges.
Die Tumorzellsuspension wurde mit Neuraminidase und Mitomycin behandelt.
Verschiedene Gruppen der Hunde wurden am Tag der Operation sowie 24 Stunden später mit unterschiedlichen Tumorzellmengen behandelt. Danach wurden die Hunde nach bestimmten Zeitintervallen klinisch untersucht, der Zeitraum der Nachuntersuchungsperiode betrug 3 Jahre. Hierbei zeigte es sich, daß sich der wesentliche therapeutische Effekt innerhalb der ersten 55 Tage nachweisen läßt.
Die Injektion von 2×10^7 Tumorzellen hatte die beste Wir-

kung hinsichtlich Tumorregression, Fernmetastasierung und Überlebenszeit.
Die Injektion von 2 x 10^6 Zellen bewirkte nur eine vorübergehende Tumorregression innerhalb der ersten 56 Tage mit nachfolgender Tumorprogression.
Die Injektion von 1 x 10^8 Zellen führte zu einer verstärkten Tumorprogression und Frühmetastasierung. Hierbei ist es noch unklar, ob die Bildung blockierender Antikörper oder eine Immunparalyse überwiegend schuld ist.
Entsprechend den Empfehlungen von BEKESI (1974) bestimmt sich die optimale Anzahl allogener neuraminidasebehandelter Tumorzellen am sichersten durch die Ermittlung einer optimalen Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ nach intradermaler Injektion einer verschieden großen Anzahl neuraminidasebehandelter Tumorzellen.

Zusammenfassend ergibt sich aus der vorliegenden Arbeit sowie aus den Ergebnissen anderer Autoren die hinreichende Vermutung, daß die Erhöhung der serumgebundenen Sialinsäure bei Tumorpatienten ein wichtiger biochemischer Parameter der tumorbedingten Immunparalyse des Wirtes ist.
Nach allen bisher vorliegenden Untersuchungen bedingt eine Entfernung der Neuraminsäure durch Neuraminidase insbesondere an der äußeren Tumorzellmembran, den Lymphozyten und Makrophagen, eine deutliche Stimulierung der für die Tumorabwehr wesentlichen zellvermittelten Immunität.
Als logische Folgerung ergibt sich daher das Postulat, bei Tumorpatienten nachzuprüfen, ob eine inverse Korrelation besteht zwischen der Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ, der blastogenen Lymphozytenreaktionen und der erhöhten Konzentration an serumgebundener Sialinsäure. Ferner wäre es interessant, festzustellen, ob sich unter einer zytoreduktiven Therapie die Konzentration an serumgebundener Sialinsäure vermindert und schließlich wäre es von Interesse,

den unterschiedlichen Verlauf insbesondere bei immuntherapierten Patienten durch Verlaufskontrollen der Konzentrationen der serumgebundenen Sialinsäure zu vergleichen. Hierbei müßten diejenigen Patienten, die auf eine Immuntherapie besonders gut ansprechen, mit einer Senkung des Sialinsäurespiegels reagieren.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit untersucht das Verhalten der serumgebundenen Sialinsäure-Konzentration im Serum von Tumorpatienten. Hierbei fand sich im Vergleich zu den Normwerten von 2,09 µmol/ml Serum in der Kontrollgruppe eine signifikante Erhöhung dieser Konzentration im Serum von Patienten mit Bronchial-Carcinom und Patientinnen mit Mamma-Carcinom auf 3,54 µmol/ml bzw. 3,45 µmol/ml.

Bei Patienten mit Tumoren anderer Organlokalisation bzw. Systemerkrankungen, die postoperativ bestrahlt wurden, ergab sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Sialinsäure-Konzentration im Serum. Bei letzterer Gruppe konnten wir aber nicht einwandfrei zwischen tumorpositiven und tumornegativen Patienten unterscheiden. Eine nicht tumorspezifische Sialinsäure-Konzentrationserhöhung durch pulmonale Infektionen ist jedoch wegen der erhöhten Werte auch bei Mammacarcinom-Patientinnen sehr unwahrscheinlich.
Da ferner auch tumorresezierte Patienten, wenn auch in geringerem Ausmaß, erhöhte Konzentrationen an Serum-Sialinsäuren aufweisen, erklären sich die bei uns nachgewiesenen Konzentrationserhöhungen in der gemischten Gruppe.
Weiterhin zeigen die vorliegenden Ergebnisse, daß die bei Tumorpatienten erhöhten Neuraminsäurewerte nicht auf eine Vermehrung des sauren α1-Glykoproteins zurückzuführen sind. Hierbei muß einschränkend erwähnt werden, daß bei Bronchial-Carcinom-Patienten eine deutliche Tendenz zu erhöhten Werten vorliegt. Infolge stark schwankender Einzelwerte mit hoher Streuung ergab sich jedoch keine signifikante Normabweichung. Diese Frage sollte an einer größeren Fallzahl abgeklärt werden.
Die möglichen Konsequenzen der erhöhten Sialinsäure-Werte im Hinblick auf die Immun-Paralyse des Wirtes sowie der derzei-

tige Stand der adjuvanten Immuntherapie mit Neuraminidase werden erörtert.
Insgesamt soll die Untersuchung weitere gezielte Experimente zur Darlegung der Zusammenhänge zwischen neuraminsäurehaltigen Glycoproteiden des Serums sowie der humoralen und zellvermittelten Immunlage des Tumorwirtes initiieren.

L I T E R A T U R

1.) Bekesi, J.G., J.P. Roboz, L. Walter, J.F. Holland: Stimulation of Specific Immunity Against Cancer by Neuraminidase-Treated Tumor Cells.
Behring Inst. Mitt. 55, 309 - 321 (1974)

2.) Bekesi, J.G., J.P. Roboz and J.F. Holland: Therapeutic Effectiveness of Neuraminidase-Treated Tumor Cells as an Immunogen In Man and Experimental Animals With Leukemia
Annals Of The New York Academy Of Sciences, 27, 313 - 331 (1976)

3.) Bekesi, J.G., J.F. Holland, R. Fleminger, J. Jates, E.S. Henderson:
Immunotherapeutic Efficacy Of Neuraminidase-Treated Allogenic Myeloblasts In Patients With Acute Myelotic Leukemia.
In: Control Of Neoplasia By Modulation Of The Immune System. Edited by: M.A. Chirigos. Raven Press, New York 573 (1977)

4.) Burnet, M.F.:
Cancer - A Biological Approach.
IV. Practical applications. Br.Med. J. 1, 844 (1957)

5.) Cormak, D.:
Effect of enzymativ removal of cell surface sialic acid on the adherence of Walker 256 tumor cells to mesothelial membrane.
Cancer Research 30, 1459 (1970)

6.) Currie, G.A.:
Masking of Antigens on the Landschütz ascites tumor.
Lancet II, 1336 (1967)

7.) Froese, G., Berczi, I.,Sehon, A.H.: Brief communication: Neuraminidase-induced enhancement of tumor growth in mice.
J. Nat. Cancer Inst. 52, 1905 (1974)

8.) Hakomori, S.:
In: 22nd Colloquium der Gesellschaft für biologische Chemie.
Ed. by D.F.H. Wallach and H. Fischer, 65,
Springer-Verlag New York, Heidelberg, Berlin (1971)

9.) Heide, K.:
The Significance of Sialic Acid in Serum Glycoproteins
In: Behring Inst. Mitt. 55, 168 - 176 (1974)

10.) Hughes, R.C., Sanford, B.H. Jeanloz, R.W.:
Regeneration of the surface glycoproteins of a transplantable mouse tumor cell after treatment with neuraminidase.
Proc. Nat. Acad.Sci. 69, 942, (1972)

11.) Im, H.M., Simmons, R.L.:
Modification of graft-versus-host desease by neuraminidase treatment of donor cells.
Transplantation 12,6, 472 (1971)

12.) Johannsen, R., Sedlacek, HH.:
Specificity of cytotoxic antibodies to autologous human lymphocytes treated with neuraminidase from Vibrio cholerae.
Behring Inst. Mitt. 55, 209 (1974)

13.) Johannsen, R., Knop, J., Sedlacek, HH., Seiler, F.R.:
Augmentation of in vitro lymphocyte response by neuraminidase:
Z. Immun.-Forsch. 152, 90 (1976)

14.) Lee, A.:
Effect of neuraminidase on the phagocytosis of heterologous red cells by mouse peripheral macrophages.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128, 891 (1968)

15.) Lindenmann, J., P.A. Klein:
Immunological aspects of viral oncolysis. Recent advances in cancer research, 9, 66,
Springer-Verlag Berlin (1967)

16.) Lüben, G., Sedlacek, HH., F.R. Seiler:
Binding of Vibrio cholerae neuraminidase (VCN) to peripheral blood lymphocytes and to cultured lymphoblastoid cells.
Behring Inst. Mitt. 59, 30 (1976)

17.) Mathé, G., Halle-Pannenka, O., Bourut, C.:
Active immunotherapy of AKR mice spontaneous leukemia.
Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol. XVII, 997, (1973)

18.) Osther, K., Linnemann, R.:
Acta path. microbiol.
Scand. Section B 81, 365 (1973)

19.) Porwit-Bobr, Z., Slowik, M., Tomecki, J.:
Effect of neuraminidase-treated and mitomycin C-treated polyoma tumor cells on the established tumor growth in CBA mice. I. An attempt at evaluation of polyoma tumor destruction using the distribution of lissamine green method.
Folia Histochemica et Cytochemica 12, 3 - 1, 315, (1974)

20.) Rios, R., Simmons, R.L.:
Active specific immunotherapy of minimal residual tumor: Excision plus neuraminidase-treated tumor cells.
Int. J. Cancer 13, 71 (1974)

21.) Rogentine, G.N.Jr., B.A. Plocinik:
Carbohydrate inhibition studies of the naturally occurring human antibody to neuraminidase-treated human lymphocytes.
J. immunol. 113, 3 (1974)

22.) Rosato, F.E., A.S. Brown, E.E. Miller, E.E. Rosato, W.F. Mullis, Johnson, J., Moskovitz, A.:
Neuraminidase immunotherapy of tumors in man.
Surgery, Gynecology and Obstetrics 139, 675, (1974)

23.) Rosato, F.E., E. Miller, E. Rosato, A. Brown, M. Wallack, J. Johnson, A. Moskovitz:
Active specific immunotherapy of human solid tumors.
Ann. N.Y. Acad. Sci. in press (1976)

24.) Sanford, B.H.:
An alteration in tumor histocompatibility induced by neuraminidase.
Transplantation 5, 1273 (1967)

25.) Sanford, B.H.:
Neuraminidase and Cancer: Possible Mechanisms of Action
Behring Inst. Mitt. 55, 306 - 308 (1974)

26.) Sedlacek, HH., F.R. Seiler:
Dose Dependency of the Effect of Syngeneic, Vibrio-Cholerae-Neuraminidase-Treated Mastocytoma Cells on the Life Span of DBA f/2 Mice
Behring Inst. Mitt. 55, 343 - 348 (1974)

27.) Sedlacek, HH., H. Meesmann, F.R. Seiler:
Regression of Spontaneous Mammary Tumors of Dogs After Injektion of Neuraminidase-Treated Tumor Cells: A Preliminary Communication
Behring Inst. Mitt. 55, 349 - 355 (1974)

28.) Sedlacek, HH., F.R. Seiler and H.G. Schwick:
Neuraminidase and Tumor Immunotherapy
Klin. Wschr. 55, 199 - 214 (1977)

29.) Sedlacek, HH., R. Johannsen, F.R. Seiler:
Possible Immunological Action Of Vibrio Cholerae Neuraminidase (VCN) In Tumor Immunotherapy
In: Proceedings I A BS Symp. London, April 1977

30.) Sedlacek, HH., F.R. Seiler:
Spontaneous Mammary Tumors In Mongrel Dogs: A Relevant Model To Demonstrate Tumor Therapeutical Success By Application Of Neuraminidase-Treated Tumor Cells
Proceedings of I ABS Symp. London, 1977

31.) Seigler, H.F., WW. Shingleton, R.S. Metzgar, C.E. Buckley, P.M. Bergoc, D.S. Miller, B.F. Fetter, M.B. Phaub:

Non-specific and specific immunotherapy in patients with melanoma.
Surgery 72,1 162 (1972)

32.) Springer, G.F., P.R. Desai, I. Banatwala:
Blood group MN specific substances and precursors in normal and malignant human breast tissues.
Naturwissensch. 61, 457 (1974)

33.) Springer, G.F., P.R. Desai:
Increase in anti-T titer scores of breast-carcinoma patients following mastectomy
Naturwissensch. 62, 587 (1975)

34.) Springer, G.F., P.R. Desai:
Depression of Thomsen-Friedenreich (anti-T) antibody in humans with breast carcinoma.
Naturwissensch. 62, 302 (1975)

35.) Springer, G.F., P.R. Desai, I. Banatwala:
Brief communication:
Blood group MN antigens and precursors in normal and malignant human breast glandular tissue.
J. Nat. Cancer Inst. 54, 2 335 (1975)

36.) Watkins, E., jr.:
Neuraminidase accentuation of cancer cell immunogenicity:
Behring Inst. Mitt. 55, 355 - 370 (1974)

37.) Weiss, L., T.L. Cudney:
Some effects of neuraminidase on the in vitro interactions between spleen and Mastocytoma (P 815) cells.
Int. J. Cancer 7, 187 (1971)

38.) Wilson, R.E., S.T. Sonis, E.A. Godrick:
Neuraminidase as an Adjunct in the Treatment of Residual Systemic Tumor with Specific Immune Therapy.
Behring Inst. Mitt. 55, 334 - 342 (1974)

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Marburg:

Nöth, Stuke, Petry, Köcke, Bock, Walcher, Dimroth, Geyer, Denicke, Mahr, Kühnel, Amon, Rohen, Rosemann, Karlson, Heuser, Pfütz, Castenholz, Thoenes, Seidl, Koch, Rupec, Schiff, Bernhardt, Schmidt, Schnell, Hering, Hennes, Schienbein, Riecken, Engelhard, Niemeyer, Keil, Schmitz-Moormann, Hordt, Janke, Schmid, Kling.

L E B E N S L A U F

Ich, Michael Marbaise, wurde am 30.4.1949 als zweiter Sohn des Zahnarztes Dr. Heinrich Marbaise und seiner Ehefrau Marianne, geb. Hörold, in Gersfeld/Rhön geboren.
Von Ostern 1954 - 1958 besuchte ich die Volksschule in Schmalnau/Rhön. Anschließend besuchte ich, bis zur mittleren Reife, das Domgymnasium in Fulda, wechselte dann zur Stiftsschule St. Johann in Amöneburg und machte dort im Juni 1967 das Abitur.
Zum Wintersemester 1967/68 begann ich an der Philippsuniversität Marburg mit dem Studium Physik und wechselte nach dem 3. Semester in das Fach Zahnmedizin über. Am 19.3.1969 bestand ich das Vorphysikum und am 26.8.71 das Physikum. Die Zahnärztliche Prüfung legte ich am 26.11.1974 ab. Danach war ich in der väterlichen Praxis als Assistent tätig, um wegen meiner Promotionsarbeit, in der Nähe von Marburg zu sein.
Am 7.7.1975 wurde ich zur Bundeswehr einberufen und verbrachte meine Wehrdienstzeit beim Marinefliegergeschwader 1 in der Nähe von Schleswig. Nachdem ich aus der Bundeswehr entlassen war, ging ich nach Marburg, um an meiner Promotion weiterzuarbeiten.
Vom 1.12.1976 bis 30.6.1977 arbeitete ich dann als Assistent in der Praxis meines Bruders, Dr. Jürgen Marbaise, in Kempten im Allgäu.
Nachdem ich die Kassenzulassung erhalten hatte, übernahm ich am 1.7.77 die väterliche Praxis in 6411 Ebersburg 1.
Seit dem 4.8.1978 bin ich verheiratet.

Ebersburg 1, den 22.9.1978